

JAM-A: Junctional Adhesion Molecule-A or Janus Acting Mediator in atherosclerosis

Citation for published version (APA):

Schmitt, M. (2014). *JAM-A: Junctional Adhesion Molecule-A or Janus Acting Mediator in atherosclerosis*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Uitgeverij BOXPress. <https://doi.org/10.26481/dis.20140630ms>

Document status and date:
Published: 01/01/2014

DOI:
[10.26481/dis.20140630ms](https://doi.org/10.26481/dis.20140630ms)

Document Version:
Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

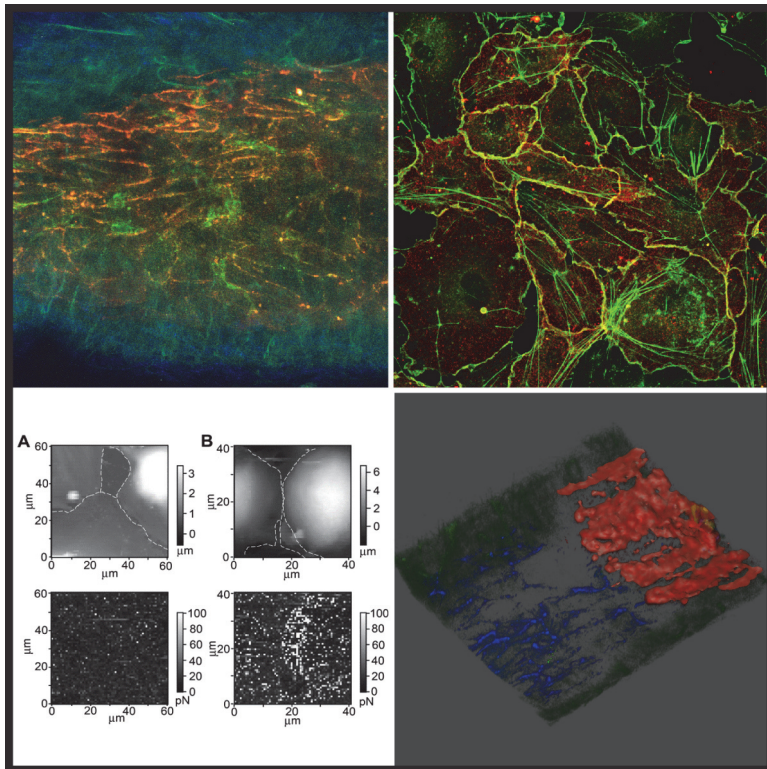
www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

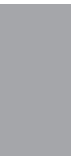
repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.



**Summary/Zusammenfassung/
Samenvatting**

Summary



Worldwide, cardiovascular diseases are the leading source of patients suffering tremendous reduction in life quality until premature death. Fighting those widely spread diseases is one of the most challenging tasks of our generation. Their multi-factorial nature allows on the one hand a broad spectrum of potential therapeutics, but on the other hand being tightly linked to the body's immune system, therapeutic drugs need to be highly specific without causing undesirable side-effects.

The most abundant cardiovascular diseases are acute myocardial infarction and stroke, which are typically instigated by stenosis of arteries as a result of rupture of advanced atherosclerotic lesions.

Atherosclerosis is a progressive and chronic disease, induced by constituents of the immune system. It is characterized by accumulation of lipids, immune cells and fibrous components in the arterial wall at predilection sites comprising altered shear stress conditions. At these sites, hyperlipidemia-triggered excess uptake of LDL-cholesterol into the vessel wall occurs and oxidation as well as acetylation of those lipids take place with subsequent activation of endothelial cells. Enhanced monocyte influx enabled by endothelial cell activation finally leads to greater prevalence of highly lipid-laden foam cells, which were macrophages differentiated from monocytes taking up oxidized LDL (oxLDL). Foam cells secrete factors contributing to a persistent inflammatory response in the vessel wall, augmenting the influx of additional monocytes and other inflammatory cell types like T cells and granulocytes. Chronic occurrence of inflammation finally leads to development of advanced atherosclerotic lesions with a necrotic core being covered by a fibrous cap. Destabilization of the fibrous cap through proteases, but also erosion and cell death will advance the plaque stage to an instable plaque phenotype. Upon plaque rupture, pro-thrombotic factors of the necrotic core will trigger coagulation and thrombus formation causing acute myocardial infarction or stroke.

Recruitment of leukocytes is an important prerequisite for atherosclerotic lesion formation. A lot of efforts had been taken to elucidate the mechanisms and molecular effectors playing a role in leukocyte recruitment. From a plurality of studies a multi-step cascade evolved, called the Leukocyte Adhesion Cascade, which however is still not studied completely.

The beginning of the Leukocyte Adhesion Cascade comprises selectin and PSGL-1-mediated leukocyte tethering to and rolling on the endothelial cell layer, followed by integrin and adhesion molecule interaction-mediated firm adhesion and transmigration along a chemokine gradient. One of those molecular players orchestrating leukocyte adhesion and transmigration is Junctional Adhesion Molecule (JAM)-A. Several studies demonstrated (sometimes even contrary) roles for JAM-A in various inflammatory disease models, but a comprehensive study identifying the roles of JAM-A harbored by different cell types regarding atherosclerotic lesion formation is still missing (chapter 1).

Therefore, the hypothesis of this thesis is that JAM-A from differing cellular origin might exert different effects on leukocyte recruitment and thus on atherogenesis, a phenomenon being of fundamental interest not only in basic science but also in drug development. Additionally, exact localization of endothelial JAM-A under inflammatory conditions would add key information to the underlying mechanisms.

In chapter 2, we were able to demonstrate atherogenic functions of endothelial JAM-A by showing decreased atherosclerotic lesion formation in mice deficient for endothelial JAM-A. In contrast, an increased lesion formation was observed in mice with leukocytic JAM-A deficiency, suggesting an atheroprotective role of leukocytic JAM-A. In transmigration assays *in vitro* and *in vivo*, deficiency of endothelial JAM-A resulted in decreased leukocyte transmigration rates contrary to deficiency of leukocytic JAM-A, which induced defect de-adhesion likely due to prolonged β_2 -integrin activity caused by absence of JAM-A-mediated integrin internalization, thereby damaging endothelial cell lining. Moreover we provided evidence that endothelial JAM-A re-localizes to apical cell site in a focal manner after treatment with cytokines or oxLDL as well as in areas of disturbed flow, thereby increasing leukocyte adhesion and transmigration. Additionally we could demonstrate an atheroprotective role of high and laminar shear stress via robust miR-145 copy synthesis, inhibiting endothelial JAM-A expression.

In order to explore the mechanisms of endothelial JAM-A re-localization more deeply (chapter 3), immuno-fluorescence based detection of JAM-A and actin revealed an increase of actin expression additional to actin re-localization and increased JAM-A/actin co-localization likely facilitated by enhanced ZO-1/JAM-A interaction after oxLDL treatment. Moreover, additional transmigration assays expanded preceding results by ruling out any Fc-based artifacts while blocking JAM-A with antibodies. Thus using anti-JAM-A Fab fragments resulted in decreased leukocyte recruitment after cytokine or oxLDL treatment. Furthermore, we were able to expand the knowledge of atheroprotective properties of the cholesterol-lowering drug lovastatin by abolishment of functional JAM-A re-localization after cytokine as well as oxLDL treatment of endothelial cells likely via junctional actin stabilization and oxLDL receptor LOX-1 expression reduction.

In a subsequent study described in chapter 4, we sought to further elucidate re-localization of JAM-A and its effect on leukocyte recruitment. By applying atomic force microscopy, we were able to show for the first time that the underlying molecular mechanism for enhanced T cell paracellular recruitment is the development of JAM-A “hot spots”, comparable to JAM-A re-localization shown in chapter 2 and 3. Those focal accumulations located near the endothelial cell-cell contacts enhance T cell junctional adhesion and facilitate their junctional recruitment.

Finally in chapter 5, we provide significant findings regarding JAM-A deficiency in thrombocytes and its outcome on atherosclerotic lesion formation. In detail, thrombotic JAM-A (trJAM-A) deficiency led to hyperreactivity and lowered activation thresholds for activators like ADP, thrombin and collagen, resulting in increased adherence and aggregation. More important, a rise of inflammatory cytokine (TNF- α and IFN- γ) levels was present and chemokine levels (CXCL4 and CCL5) were enhanced in mice specifically lacking trJAM-A. Additionally, we found higher platelet-leukocyte interaction triggered by trJAM-A deficiency. Those factors finally resulted in enhanced atherosclerotic lesion formation, which was most pronounced in the early phase.

In chapter 6, the results described in this thesis and their potential use in drug and diagnostic marker development were discussed and put into perspective. In conclusion, this thesis provides novel insights into JAM-A's contribution in atherosclerotic lesion formation regarding cellular origin, leukocyte infiltration mechanism and potential interference.

Zusammen- fassung

Herz- und Gefäßkrankheiten sind der häufigste Grund für starke Einschränkungen in der Lebensqualität bis hin zum Tod von Patienten weltweit. Der Kampf gegen diese weit verbreiteten Krankheiten ist eine der größten Herausforderungen unserer Zeit. Zwar erlauben Herz- und Gefäßkrankheiten auf Grund ihrer mannigfaltigen Kausalitäten auch ein großes Repertoire an verschiedenen Wirkstoffen, doch die enge Verbindung vom Immunsystem zu Herz- und Gefäßkrankheiten erlauben nur Therapien, die absolut frei von Nebenwirkung sind.

Die wichtigsten Herz- und Gefäßkrankheiten stellen akutes Herzversagen und Schlaganfall dar, welche typischer Weise durch Stenose von arteriellen Gefäßen als Resultat eines Aufbruchs fortgeschrittener atherosklerotischer Läsionen ausgelöst werden.

Atherosklerose ist eine chronisch progressive Krankheit, ausgelöst von Bestandteilen des Immunsystems. Sie wird durch die Anhäufung von Lipiden, Immunzellen und fibrotischem Material in der Gefäßwand von sogenannten „predilection sites“, welche veränderte Scherflussraten aufweisen, charakterisiert. An diesen „predilection sites“ kommt es, ausgelöst durch eine Hyperlipidämie, zur erhöhten Aufnahme von LDL-Cholesterin in die Gefäßwand. Eine oxidative Veränderung des LDLs hat weiterhin eine von oxidierten LDL (oxLDL) induzierte Aktivierung von Endothelzellen zur Folge. Eine durch Aktivierung der Endothelzellschicht ermöglichte erhöhte Rekrutierung von Monozyten wiederum führt zu einem gesteigerten Vorkommen von Schaumzellen, deren Inhalt hauptsächlich oxidierte Lipide darstellen. Eine langanhaltende Entzündung der Gefäßwand wird von Schaumzellen sezernierten Faktoren ausgelöst, was eine erhöhte Rekrutierung von weiteren Immunzellen wie T Zellen und Granulozyten bewirkt. Die chronische Entzündung der Gefäßwand führt letztendlich zur Entwicklung von fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsionen, charakterisiert durch einen Kern nekrotischer Zellen überlagert von einer Kappe aus fibrotischem Material. Durch Protease-vermittelter Destabilisierung der fibrotischen Kappe, sowie durch zusätzlicher Nekrose und Erosion der Läsion wird diese instabil. Nach Aufbruch der instabilen Läsion gelangen prothrombotische Faktoren aus dem nekrotischen Kern in die Blutzirkulation, was eine Koagulation des Blutes bewirkt. Dies hat einen Verschluss und damit einen akuten Herzinfarkt oder Hirnschlag zur Folge.

Für das Entstehen atherosklerotischer Läsionen ist die Rekrutierung von Leukozyten eminent wichtig. Viele Anstrengungen wurden bis jetzt unternommen, um Mechanismen und molekulare Effektoren der Leukozyten-Rekrutierung zu identifizieren. Daraus konnte ein heutzutage allgemeingültiger Mechanismus abgeleitet werden, die sogenannte Leukozyten Adhäsions Kaskade, deren Gesamtbild trotz aller Bemühungen noch nicht vollständig ist.

Der Anfang der Leukozyten Adhäsions Kaskade stellt ein Selektin und PSGL-1 vermitteltes loses Anheften und Rollen von Leukozyten an und über die

Endothelzellschicht dar, gefolgt von der festen Adhäsion und transendothelialen Migration der Leukozyten durch Integrin und Adhäsionsmolekül vermittelter Interaktion entlang eines Chemokingradienten. Ein wichtiges Molekül, welches Leukozyten-Adhäsion und -Transmigration vermittelt, ist das Junktionale Adhäsionsmolekül (JAM)-A. Mehrere Studien zeigen einen (teilweise sogar entgegengesetzten) Einfluss von JAM-A auf verschiedene Modelle entzündlicher Krankheiten, doch eine Studie bezüglich der Identifikation der einzelnen zellspezifischen Rollen von JAM-A auf atherosklerotischer Läsionsbildung fehlt bis heute (Kapitel 1).

Deswegen lautet die Hypothese dieser Arbeit, dass JAM-A exprimiert durch unterschiedliche Zelltypen diverse Effekte auf die Leukozyten-Rekrutierung und damit auf die Entstehung atherosklerotischer Läsionen ausübt. Das Wissen um unterschiedliche Funktionen ist nicht nur von fundamentalem Interesse für die Grundlagenforschung, sondern auch für die Wirkstoffentwicklung. Zusätzlich trägt eine exakte Lokalisierung von endothelialen JAM-A unter entzündlichen Bedingungen zum Verständnis des zugrundeliegenden Mechanismus der Leukozyten-Rekrutierung bei.

In Kapitel 2 beschreiben wir eine atherogene Funktion von endothelialen JAM-A durch verminderte Läsionsbildung und Leukozyten-Rekrutierung bei Abwesenheit dieses Proteins im Kontrast zu der atheroprotektiven Funktion von leukozytärem JAM-A beschrieben durch erhöhte Läsionsbildung und Leukozyten-Rekrutierung in Mäusen mit JAM-A^{-/-} Leukozyten. *In vitro* und *in vivo* Transmigrations-Versuche mit Endothelzellen defizient für JAM-A bestätigten die verminderte Rekrutierung gegensätzlich zur Defizienz von leukozytärem JAM-A, was zu einer gestörten β_2 -Integrin vermittelten De-Adhäsion und damit zur Verletzung der endothelialen Integrität führt. Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass eine erhöhte Leukozyten-Rekrutierung in Zuge von Behandlungen mit oxLDL oder Zytokinen oder in Bereichen mit veränderten Scherflussraten durch eine lokale Umverteilung von endothelialen JAM-A zur apikalen Endothelzelloberfläche vermittelt wird. Weiterhin erforschten wir einen weiteren atheroprotektiven Mechanismus von hohen und laminaren Scherflussraten. Diese bewirken eine starke Erhöhung der miR-145 Synthese, welche wiederum die Expression von endothelialen JAM-A inhibiert.

Um den zugrundeliegenden Mechanismus der endothelialen JAM-A Umverteilung weiter zu erforschen konnten wir durch Immunfluoreszenz-basierte Detektion von JAM-A und Aktin belegen, dass eine Behandlung mit oxLDL erstens eine Erhöhung der Aktin-Expression, zweitens eine Aktin-Umverteilung und drittens eine erhöhte JAM-A/Aktin Ko-Lokalisation, vermittelt durch stärkere ZO-1/JAM-A Interaktion, bewirkt (Kapitel 3). Darüber hinaus erweitern wir die vorherigen Ergebnisse der Leukozyten-Transmigrationsversuche nach Antikörper-vermittelter JAM-A Blockade um eine

Erniedrigung der oxLDL und Zytokin getriggerten Leukozyten-Rekrutierung nach Blockade mit anti-JAM-A Fab-Fragmenten. Dies zeigt, dass eventuelle Fc-basierte Artefakte während einer Antikörper-vermittelten Blockade von JAM-A hier keine Rolle spielen. Um Informationen über eine pharmakologische Beeinflussbarkeit der JAM-A Funktionen zu erhalten wurde mitunter Lovastatin in Lokalisations- und Transmigrations-Studien eingesetzt. Hierbei konnten wir zeigen, dass Lovastatin als atheroprotektiven Effekt nicht nur Einfluss auf den Cholesterinspiegel hat, sondern auch die oxLDL und Zytokine getriggerte endotheliale JAM-A Umverteilung sowie die Leukozyten-Rekrutierung hemmt.

In einer weiterführenden Studie betrachteten wir genauer die JAM-A Umverteilung und ihren Einfluss auf die Leukozyten-Rekrutierung (Kapitel 4). Mit Hilfe der „atomic force“ Mikroskopie konnten wir zum ersten Mal beweisen, dass der zugrundeliegende Mechanismus für erhöhte T Zell Rekrutierung die Entwicklung von endothelialen JAM-A „hot-spots“ darstellt. Diese lokalen Akkumulationen von JAM-A Molekülen nahe aber nicht in den Zell-Zellkontakten zeigen eine vergleichbare Struktur wie die JAM-A Umverteilung aus Kapitel 2 und 3 und sind für eine erhöhte T Zell Adhäsion und Rekrutierung entlang der Zell-Zellkontakte eminent wichtig.

Die in Kapitel 5 dargestellten Ergebnisse verweisen auf eine wichtige Rolle von thrombozytärem JAM-A (trJAM-A) in der atherosklerotischen Läsionsbildung. So konnten wir zeigen, dass trJAM-A-Defizienz für eine Hyperreaktivität der Thrombozyten mit erniedrigter Aktivierungsschwelle für ADP, Thrombin und Kollagen verantwortlich war, was folglich zu erhöhter Thrombozyten-Adhärenz und Aggregation führte. Weiterhin waren höhere Level inflammatorischer Zytokine (TNF- α und IFN- γ) und Chemokine (CXCL4 und CCL5) in Mäusen mit spezifischer trJAM-A Defizienz detektierbar. Darüber hinaus fanden wir eine erhöhte Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion. Diese Faktoren resultierten letztendlich in einer Erhöhung der atherosklerotischen Läsionsbildung, die besonders im frühen Stadium ausgeprägt war.

Mit Kapitel 6 diskutieren wir die in Kapitel 2 bis 5 dargestellten Ergebnisse und nehmen Bezug zu einer potenziellen Nutzung von JAM-A in der Entwicklung von diagnostischen Markern und neuen Wirkstoffklassen. Zusammenfassend bietet diese Arbeit neuartige Erkenntnisse zur Rolle von JAM-A exprimiert von verschiedenen Zelltypen in der atherosklerotischen Läsionsbildung einhergehend mit Leukozyten-Rekrutierung sowie deren Mechanismus und Intervention.

Samenvatting

Wereldwijd zijn hart- en vaatziekten de oorzaak van een sterk verminderde levenskwaliteit en vroegtijdig overlijden. Het bestrijden van deze ziekten is dan ook een van de grootste uitdaging van deze tijd. De multifactoriële aard van deze ziekten biedt vele mogelijkheden voor therapeutische interventie, maar tegelijker zullen, gezien de sterke link met het immuunsysteem, potentiële geneesmiddelen erg specifiek moeten zijn, om het veroorzaken van onwenselijke bijwerkingen te voorkomen.

De meest voorkomende hart- en vaatziekten zijn hart- en herseninfarcten, die voornamelijk veroorzaakt worden door vernauwing van slagaders als gevolg van ruptuur van vergevorderde atherosclerotische laesies.

Atherosclerose, ook wel bekend als aderverkalking, is een progressieve chronische ziekte, die wordt gekarakteriseerd door een opeenhoping van vetten, ontstekingscellen en vezelachtig materiaal in de bloedvatwand van slagaders. Atherosclerose ontstaat op plekken van veranderde bloedstroomprofielen, waar LDL-cholesterol de vaatwand kan binnendringen, geoxideerd of geacetyleerd kan worden en vervolgens leidt tot activatie van endotheelcellen. Ten gevolge hiervan zullen monocytten de vaatwand binnengaan, differentiëren tot macrofagen onder invloed van het geoxideerde LDL (oxLDL), en verder ontwikkelen tot met vet gevulde schuimcellen. Deze schuimcellen scheiden stoffen uit die zorgen voor een aanhoudende ontstekingsreactie, gekenmerkt door influx van meer monocytten, maar ook ontstekingscellen als T-cellen en granulocyten. De chronische inflammatoire reactie zorgt op termijn voor de ontwikkeling van een vergevorderde atherosclerotische laesie met een necrotische kern omgeven door een fibreus kapsel. Destabilisatie van dit kapsel door proteolytische enzymen, erosie en celdood leiden tot een instabiele laesie. Wanneer een dergelijke instabiele laesie scheurt, komen pro-thrombotische factoren van de necrotische kern in contact met het bloed, hetgeen leidt tot vorming van een bloedstolsel met een hart- of herseninfarct tot gevolg.

Rekrutering van leukocyten is een vereiste in de ontwikkeling van atherosclerose. Er is reeds veel onderzoek gedaan om de onderliggende moleculaire mechanismen die hierbij een rol spelen te ontrafelen. Uit voorgaand onderzoek is gebleken dat een meerstaps proces gekomen dat bekend staat als de leukocyt adhesie cascade een belangrijke rol speelt, hoewel dit proces nog niet volledig begrepen is.

De leukocyt adhesie cascade start met selectine- en PSGL-1-afhankelijke binding van leukocyten aan en het rollen van deze leukocyten over het endotheel. Vervolgens zorgt interactie van integrines en adhesiemoleculen voor binding van leukocyten aan het endotheel, hetgeen gevolgd wordt transmigratie van de leukocyt over de endotheelcellaag naar een chemokine-gradiënt. Een belangrijke factor die betrokken is bij de adhesie en transmigratie van leukocyten is Junctional Adhesion Molecule (JAM)-A. Voorgaand onderzoek heeft aangetoond dat JAM-A een rol heeft in modellen van

verschillende inflammatoire ziektes, alhoewel de resultaten van deze studies soms tegenovergestelde resultaten laten zien, en er nog geen duidelijkheid over is over de rol van JAM-A in de verschillende celtypes die een rol spelen in atherosclerose (hoofdstuk 1).

Daarom is de hypothese van dit proefschrift dat JAM-A in verschillende celtypes verschillende effecten heeft op rekrutering van leukocyten en de ontwikkeling van atherosclerose, hetgeen ook van belang is voor de ontwikkeling van therapeutische interventies. Bovendien zal het bepalen van de lokalisatie van endotheliaal JAM-A tijdens inflammatoire condities belangrijke informatie verschaffen over de onderliggende moleculaire mechanismen.

In hoofdstuk 2 konden we aantonen dat JAM-A op het endotheel een pro-atherogene functie heeft. Door gebruik te maken van muizen die geen endotheliaal JAM-A hebben, kon een verminderde atherosclerotische laesievorming worden gedemonstreerd. Muizen met een deficiëntie voor JAM-A op leukocyten, lieten het tegenovergestelde zien, hetgeen wijst op een beschermende rol van JAM-A op leukocyten in de ontwikkeling van atherosclerose. Hierbij lieten in vitro en in vivo transmissie-studies zien dat deficiëntie voor JAM-A op het endotheel resulteerde in een verminderde transmissie van leukocyten. Daarentegen leidde het ontbreken van JAM-A op leukocyten tot een verstoorde de-adhesie van de leukocyten en beschadiging van het endotheel, waarschijnlijk veroorzaakt door versterkte β_2 -integrine activatie als gevolg van de afwezigheid van JAM-A afhankelijke internalisatie van integrines. Verder konden we aantonen dat endotheliaal JAM-A focaal geherdistribueerd wordt naar het apicale membraan, zowel na stimulatie met cytokines of oxLDL, als ook op plaatsen van verstoorde flow. Hierdoor wordt adhesie en transmissie van leukocyten versterkt. Ook kon worden aangetoond dat hoge en laminaire flow tegen de vorming van atherosclerose beschermt door middel van verhoogde aanmaak van miR-145 die de expressie van endotheliaal JAM-A vermindert.

In hoofdstuk 3 hebben we bestudeerd welke mechanismen betrokken zijn bij herdistributie van endotheliaal JAM-A na stimulatie met oxLDL. Op basis van immunofluorescente detectie van JAM-A en actine hebben we aangetoond dat na oxLDL-stimulatie niet alleen actine-herdistributie plaatsvindt, maar dat ook de expressie van actine werd verhoogd. Ook was er een sterkere colokalisatie van JAM-A/actine, waarschijnlijk ten gevolge van de sterkere interactie tussen JAM-A en ZO-1 na behandeling met oxLDL. Bovendien konden we aantonen dat de effecten van behandeling met anti-JAM-A antilichamen op leukocyte-transmissie die we voorheen beschreven hadden specifiek het gevolg waren van het anti-JAM-A Fab fragment van het antilichaam. Gebruik van enkel deze fragmenten, in plaats van het volledige antilichaam, resulteerde ook in verminderde rekrutering van leukocyten na behandeling met cytokines en oxLDL. Verder hebben we ook meer inzichten verkregen in de beschermende werking van het cholesterol-verlagende middel

lovastatine, en zagen we dat lovastatine de herddistributie van JAM-A na oxLDL- of cytokine-stimulatie verhinderde. Dit was waarschijnlijk het gevolg van stabilisatie van actine in de celjuncties en een verminderde expressie van de oxLDL-receptor LOX-1.

Vervolgens hebben we ook getracht meer inzicht te krijgen in het effect van herddistributie van JAM-A op rekrutering van leukocyten (hoofdstuk 4). Door middel van atomic force microscopie konden we aantonen dat voor paracellulaire rekrutering van T-cellen de vorming van JAM-A hotspots noodzakelijk was, vergelijkbaar met de herddistributie van JAM-A die we reeds beschreven hadden in hoofdstuk 2 en 3. Deze hotspots waren met name gelokaliseerd bij de endotheliale cel-cel-contacten, en versterkten de adhesie van de T-cellen, die nodig is om rekrutering te bewerkstelligen.

Aansluitend hebben we in hoofdstuk 5 de rol onderzocht van deficiëntie van JAM-A op bloedplaatjes en de invloed hiervan op de vorming van atherosclerotische laesies. Hier bleek dat deficiëntie van JAM-A op bloedplaatjes (trJAM-A) leidde tot hyperreactiviteit van bloedplaatjes en een verlaagde activatiedrempel voor ADP, thrombine en collageen, hetgeen resulteerde in een versterkte adhesie en aggregatie van de bloedplaatjes. Bovendien toonden trJAM-A-deficiente muizen een verhoogde expressie van pro-inflammatoire cytokines (TNF- α en IFN- γ) en chemokines (CXCL4 en CCL5), en waren er meer interacties tussen bloedplaatjes en leukocyten. Samen zorgden deze factoren voor een versterkte vorming van atherosclerotische laesies, met name in de vroege fase van de laesie-ontwikkeling.

In hoofdstuk 6 werden tot slot de resultaten beschreven in dit proefschrift en de implicaties hiervan bediscussieerd en in perspectief geplaatst en werden de mogelijkheden voor het gebruik van JAM-A als diagnostische of therapeutische target besproken. In conclusie geeft dit proefschrift nieuwe inzichten in de rol van JAM-A in de ontwikkeling van atherosclerose, met name met betrekking tot de cel-type specifieke rol van JAM-A, de mechanismen die betrokken zijn bij rekrutering van leukocyten en potentiële interventies.

